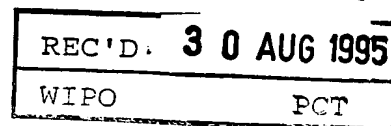


KONINKRIJK DER



NEDERLANDEN

Bureau voor de Industriële Eigendom



PRIORITY DOCUMENT

Hierbij wordt verklaard, dat in Nederland op 31 augustus 1994 onder nummer 9401404,
ten name van:

Victor SMIT

te Delft

een aanvraag om octrooi werd ingediend voor:

"Graduele chemische modificatie van biologisch actieve peptiden en eiwitten",

en dat de hieraan gehechte stukken overeenstemmen met de oorspronkelijk ingediende stukken.

Rijswijk, 17 april 1997.

De Directeur van het Bureau voor de Industriële Eigendom,
voor deze,

P.R.T.F. Tupan.

Graduele chemische modificatie van biologisch actieve peptiden en eiwitten.

5

Uittreksel:

De onderhavige uitvinding betreft de graduele modificatie van biologische actieve peptiden en eiwitten, in het bijzonder met een specifiek reagens. Uitgangspunt is het idee dat biologisch belangrijke aminozuren snel chemische interacties aangaan. Door de reactie op stapsgewijs toenemende manier uit te voeren ontstaat een voorkeur voor chemische modificatie van biologisch belangrijke aminozuren. Zo wordt met minimale modificatie een gewenste biologische activiteitsverandering aangebracht. De gewenste biologische activiteitsverandering is bij voorkeur een of meer van de volgende veranderingen: Een verbeterde werking, een verlaagde antigeniciteit, een antagonistische werking, een celremmende werking. De met behulp van bovenstaande technieken gevonden nieuwe producten en het gebruik van die producten vallen binnen de omvang van de uitvinding. Optimale besturing van de modificatie kan verkregen worden met een techniek om modificaties in een peptide of eiwit te lokaliseren met behulp van een protease behandeling en massa spectrometrie. Behalve eenvoudige dialyse is er geen enkele zuivering nodig, waardoor met kleine hoeveelheden van het natuurlijke peptide of eiwit een gewenste biologische activiteitsverandering aan te brengen is. De werkwijze is bovendien eenvoudig, snel en maakt structurele verificatie van het gemodificeerde eiwit of peptide praktisch uitvoerbaar. Dit heeft tot gevolg dat het mogelijk is om in combinatie met biologische assays een volledige structuur-functie relatie onderzoek uit te voeren. Bovendien is ook gevonden dat er door modificatie van direct of indirect bij katalytische activiteit betrokken en bij voorkeur Histidine -residuen van een signaal peptide of eiwit een nieuwe, bij voorkeur antagonistische werking en/of celremmende werking geïntroduceerd kan worden. Hierbij is de modificatie bij voorkeur chemisch en bij voorkeur gradueel. Bovendien wordt de reactie bij voorkeur uitgevoerd onder omstandigheden waarbij metaalionen aan het peptide of eiwit onttrokken worden.

Graduele chemische modificatie van biologisch actieve peptiden en eiwitten.

Wetenschappelijk gebied van de uitvinding:

5

Deze uitvinding is op het gebied van de chemische modificatie technologie van biologisch actieve peptiden of eiwitten. Met name wordt ingegaan op de mogelijkheden om met de chemische modificatie een beter, c.q. tegengesteld, c.q. anders werkend peptide of eiwit te krijgen. Bovendien wordt ingegaan op de mogelijkheden van

10 structuur-functie onderzoek met behulp van graduele chemische modificatie, protease behandeling en massa spectrometrie.

Als voorbeeld wordt ingegaan op de chemische modificatie van het bloed hormoon humaan Interleukine-3, dat na chemische modificatie grote therapeutische mogelijkheden heeft. Echter, iemand die kundig is op het gebied van de reeds genoemde combinatie van

15 technieken kan deze op ieder eiwit of peptide toepassen. Derhalve wordt iedere toepassing van deze combinatie van technieken geacht onder het patent te vallen.

Toepassingsgebied van de uitvinding:

20

Het toepassingsgebied van de uitvinding kan zeer veel omvattend worden omdat alle deling, groei, differentiatie, rust, sterfte, dedifferentiatie en onderlinge afstemming van cellen gereguleerd wordt door signaalstoffen, waarvan een zeer grote en belangrijke groep die van de eiwitten en peptiden is. Bovendien is het beschreven structuur functie-

25 onderzoek in principe mogelijk voor alle eiwitten en peptiden met een biologische activiteit en modificeerbaar en specifiek fragmenteerbaar zijn. Hierdoor zou de uitvinding toepasbaar kunnen worden bij een groot aantal bio-industrieën, zoals de medische, veterinaire, cosmetische, voedsel en wasmiddelen industrie.

Ter illustratie kan meer specifiek in gegaan worden op het toepassingen van het gemodificeerde IL-3:

30

Mogelijke toepassingen van IL-3 met een verbeterde werking zijn:

- verkorting van de cytopenische fase na myeloablatieve therapie, zoals na de inductie therapie voor beenmergtransplantatie of na accidentele radiatie.
 - inductie van een gesynchroniseerde celcyclus van cellen met een IL-3 receptor,
- 35 b.v. voor chemotherapie van leukemieën.

- inductie van enhancement van de IL-3 afhankelijke celnakomelingen, zowel wat betreft aantal als wat betreft activatietoestand, voor behandeling van ziekten, b.v. worminfecties, tuberculose, schimmel-infecties, bepaalde virus-infecties.
- selectieve uitgroei van het beenmerg in de richting van kernhoudende cellen maar niet lymphocyten, b.v. bij brandwonden met non-homologe huidtransplantaten.

Mogelijke toepassingen van IL-3 met een cel- remmende of antagonistische werking zijn:

- myeloablatie voor beenmergtransplantatie.
- myelosuppressie, bij auto-immuunziekten, bij kanker en bij ziekten van de bloedvormende organen, zoals sikkelcel bloedarmoede en de thalassemie.
- op genezing gerichte behandeling van alle kankersoorten met een IL-3 receptor, met name vrijwel alle vormen van acute myeloïde leukemie.
- inductie van tolerantie tegen eigen weefsels bij autoimmuunziekten, door ablatie van lymfoïde cellen met de IL-3 receptor. Ook kan ablatie van effectorcellen als de eosinofiele granulocyt geïnduceerd worden of kan de aanmaak ervan worden onderdrukt. Tenslotte is ook een directe werking op deze cellen mogelijk waarbij zelfgenezing van de eosinofiele syndromen ontstaat. Dit is van groot belang bij acute beelden van worminfecties en overgevoeligheidsreacties, zoals voor geneesmiddelen.
- Genezing van de eosinofiele syndromen van onbekende oorzaak, zoals eosinofiele gastritis en enteritis, fascitis, granulomatosis, pneumonie, asthma, Churg Strauss syndrome en andere angitisbehandelingen van het shock syndroom, door doding of vermindering van het aantal effectorcellen.
- Ablatie of suppressie van cellen met de IL-3 receptor, met name lymfoïde cellen of effector cellen zoals de eosinofiele granulocyt voor behandeling van alle allergieën. Hierbij kan zowel worden gedacht aan onderdrukking van de allergie als aan inductie van tolerantie voor het allergeen.

Het vierde voorbeeld illustreert nieuwe technieken om de producten van modificatie van peptiden of eiwitten te karakteriseren. Dit voorbeeld betreft localisatie van modificaties met behulp van protease behandeling en massaspectrometrie en is toepasbaar voor ieder eiwit of peptide dat met een protease of op andere wijze specifiek gefragmenteerd kan worden.

Het vijfde voorbeeld, het Kwantitatieve Structuur-Functie Relatie onderzoek met behulp van graduele chemische modificatie, protease behandeling en Massa Spectrometrie is de combinatie van de hiervoor beschreven technieken.

Achtergrond van de uitvinding:

(humaan) Interleukine-3:

- 5 Voor Interleukine-3, een glycoproteïne geïsoleerd van T-cellen, is aangetoond dat het op beenmerg cellen aangrijpt en deze eventueel samen met andere groeifactoren, aanzet tot vorming van de verschillende bloedcellen. Het humane Interleukine-3 (hIL-3) is voor het eerst gecloneerd in 1987 door Dorssers et. al. met behulp van een humane c-DNA bank en hybridisatie met een probe van muizen IL-3 DNA ¹.

10

Structuur-functie relatie van humaan Interleukine-3:

- Verschillende artikelen zijn gepubliceerd betreffende het onderzoek naar de structuur-functie relatie van humaan Interleukine-3²⁻⁶. Bij deze onderzoeken is gebruik gemaakt van moleculair biologische technieken zoals de generering van deletie- en substitutie mutanten. Hierbij is de keuze van de substitutiemutaties gebaseerd op
- 15 aminozuurhomologie met IL-3 van andere soorten (muis, rhesus aap, gibbon), of op veranderingen in polariteit of structuur. Bij de deletiemutanten worden stukken uit het eiwit verwijderd en zo wordt het molecuul afgescand. I.v.m. de praktische moeilijkheden m.b.t. de zuivering van de mutanten zijn deze vervolgens op geen enkele wijze
- 20 gecontroleerd op grote structuurveranderingen. Dit is een groot probleem daar het waarschijnlijk is dat deze veranderingen in veel gevallen plaats vinden en soms zelfs beoogd worden ². Dit heeft tot gevolg dat uitspraken over betrokkenheid van verschillende aminozuren in de biologische activiteit alleen met een groot voorbehoud gedaan kunnen worden.

- 25 De onderhavige uitvinding bevat een andere benadering. Er wordt uitgegaan van natief hIL-3 en het idee dat biologisch belangrijke aminozuren ook chemische interacties aangaan. Door de reactie op stapsgewijs toenemende manier uit te voeren ontstaat een selectiviteit in chemische modificatie. De een combinatie van technieken zoals de stapsgewijs gradueel toenemende modificatie, natieve electrophorese, CD-spectroscopie,
- 30 specifieke protease behandelingen, massaspectrometrie en een test op biologische activiteit wordt met minimale modificatie een gewenste biologische activiteits verandering aangebracht. Het kan uitgevoerd worden met zeer kleine hoeveelheden uitgangsmateriaal en het gemodificeerde materiaal hoeft niet gezuiverd te worden voor de betreffende technieken. Bovendien zijn geen kwantificaties nodig van de moleculen met
- 35 een bepaald aantal modificaties of de distributie van de verschillend gemodificeerde

vormen. Er zijn dus ook geen opbrengstproblemen. Daaruit volgt weer dat er makkelijk gecontroleerd kan worden op secundaire structuur.

5 Bij activiteitsveranderingen kunnen de modificaties worden gelokaliseerd met specifieke proteases en massaspectrometrie (ook weer zonder zuivering). Voor het vinden van gemodificeerde eiwitten of peptiden met een veranderde of verbeterde werking is deze uitvinding is dus een verbetering t.o.v. moleculair biologische technieken omdat de benadering eenvoudiger is, beter is te controleren en sneller is uit te voeren dan de moleculair biologische benadering.

10 Gemodificeerde groeifactoren:

Functionele verbeteringen:

15 Bij veel van de structuur-functie onderzoeken op allerlei groeifactoren zijn mutanten gevonden die een verbeterde activiteit vertoonden. Bijvoorbeeld in de Europese patentaanvraag EP-131816 wordt gestreeft naar een verhoogde biologische activiteit en minder bijwerkingen van β -Interferon. Ook voorbeelden van chemische modificaties zijn ruim voorhanden: bijvoorbeeld in de Europese patentaanvraag EP-236987 wordt IL-2 gemodificeerd waarbij een minder toxische en minder immunogene stof ontstaat die ook later geklaard wordt. Octrooiaanvraag EP-0442724 beschrijft gePEGyleerd IL-6 waarbij
20 een product ontstaat met een langere halveringstijd en een verhoogde biologische activiteit. De octrooiaanvraag WO 88/01511 beschrijft succinylering van IL-2 waarmee een verhoogde oplosbaarheid bereikt wordt. In al deze octrooiaanvragen wordt geen modificatie-strategie gegeven behalve hoogstens een 'trial en error' benadering, waarbij gepoogd wordt om op milde wijze een of enkele modificaties op het molecuul aan te
25 brengen. Bovendien was bijvoorbeeld bij de reeds genoemde PEG-ylering van IL-6 een zuivering nodig waarbij maar 10 % van het gewenste polypeptide overbleef. Waar de modificaties terecht kwamen werd in geen van de uitvindingen nagegaan.

Bij onderhavige werkwijze treedt vrijwel geen verlies op en kunnen de plaatsen van de modificaties wel bepaald worden. Bovendien blijkt (voorbeelden 1, 3 en 4) dat het
30 mogelijk is via graduele modificatie op specifieke wijze aminozuren op 1 specifieke plek in het molecuul te modificeren. Hoewel de meeste modificaties met irreversibele agentia gedaan worden, kunnen ook modificaties met reversibele agentia gedaan worden. Dit heeft tot gevolg dat met graduele chemische modificatie ook selectief andere residuen gemodificeerd kunnen worden.

35

Modificatie ter verkrijging van een antagonist of een peptide of eiwit met een gewijzigde eigenschap :

In het Europese patent EP-0413383A1 wordt wel gesproken van een antagonistisch effect van een humane Interleukine-3 mutant. Het gaat hier echter om een verhouding
5 van de nog aanwezige biologische activiteit t.o.v. de capaciteit om de binding van natief IL-3 aan de receptor te voorkomen. De absolute onderdrukking van de activiteit van de natieve groeifactor is dus niet aangetoond.

Er zijn wel andere echte antagonisten gevonden voor receptoren van Bovine groei
hormoon⁷, muizen IL-2⁸, humaan hepatocyt groeifactor⁹, IL-1⁸ en IL-4¹⁰. Ook in al
10 deze publicaties wordt geen modificatie-strategie gegeven, het waren bijproducten van structuur functie onderzoek. Bovendien waren er concentraties remmer nodig die gemiddeld een factor honderd boven de groeifactor-concentratie zaten. Dit zijn concentraties die de klinische toepasbaarheid ernstig belemmeren.

De enige andere antagonist die gemaakt is m.b.v. een van te voren bepaalde strategie was
15 afgeleid van humaan groeihormoon¹¹. Het was gebaseerd op de ontwrichting van een van de twee receptor binding-sites van het hormoon. Ook hier nam de capaciteit voor de receptor binding met een factor 50 af, hetgeen daarom ook een bezwaarlijke overmaat van remmer t.o.v. de groeifactor vergt.

Met de onderhavige uitvinding kan wel een klinisch toepasbare remming kan worden
20 gevonden, zelfs met een vergroting van de receptor bindingscapaciteit. Het verkrijgen van deze remmer met volledige receptorbinding kan verklaard worden met het model dat de groeifactor na receptorbinding zelf als katalisator van een chemische reactie optreedt. Dit idee wordt versterkt doordat IL-3 een katalytisch Zn-ion bevat¹². De betreffende chemische modificatie is er dan ook op gericht om residuen die bij zo'n veronderstelde
25 katalyse direct of indirect betrokken zijn, zo specifiek mogelijk te modificeren, zonder de receptorbinding aan te tasten. Het uitgangsmateriaal kan ieder signaal peptide- of eiwit-bevattende substantie zijn. Het kan echter wel nodig zijn om het te modificeren molecuul reversibel te denatureren en chelerende agentia toe te voegen om de 'katalytische residuen' te kunnen modificeren, daar zij anders beschermd worden door de
30 structuur van het eiwit of peptide of door bindende metaalionen. Als illustratie van de uitvinding wordt in voorbeeld 2 de modificatie behandeld met Joodacetaat, dat bij die pH histidines alkyleert. De methode kan echter toegepast worden door iemand die vakkundig is in dit gebied, zowel met andere reagentia, als op andere bij katalytische activiteit betrokken residuen, als met andere peptiden of eiwitten. Die applicaties worden
35 dan ook geacht ook onder de uitvinding te vallen.

Voorbeelden:

Voorbeeld 1:

- 5 Graduele chemische modificatie van IL-3 met respectievelijk Acetic anhydride en Succinic anhydride ter verkrijging van een verbeterd IL-3 met een verhoogde activiteit of een verhoogde stabiliteit.

Materialen en methoden:

Chemische modificatie:

- 10 Acetate/NaOH werd gebruikt voor modificatie bij pH 5.0 en MES(2-N-Morpholino]ethane sulfonic acid)/NaOH voor pH 5.5, 6.0, and 6.5. Phosphate/NaOH buffer werd gebruikt voor pH 7.0. Stock oplossingen van 0.5 M werden na het maken direct met een .22 micron filter-gesterriliseerd. Het reactie mengsel bevatte 50 mM buffer, 2 mg/ml hIL-3 en respectievelijk 3 mM acetic anhydride of succinic anhydride.
- 15 De 10 keer geconcentreerde stock oplossing van deze reagentia in dioxane werden voor gebruik altijd vers gemaakt. Modificatie gebeurde overnacht bij 30 °C. Na de modificatie reactie werd gecontroleerd op degradatie met SDS-electrophoresis .

Activiteitstesten:

- 20 Biologische activiteit is bepaald als groei stimulatie van een IL-3 afhankelijke cel-lijn, de MO-7 cel-lijn(Avanzi, 1988 #33) (een gift van dr. I. Touw; Erasmus University, Rotterdam). Testen werden uitgevoerd in RPMI 1640 culture medium (GIBCO; Paisly, England), met 10 % Supplemented Bovine Calf Serum (Hyclone; Logan, Utah, USA). Na respectievelijk 6 en 10 dagen celweek van $4 \cdot 10^5$ MO-7 cellen/ml bij 37 ° C and 5 %
- 25 CO₂, werd de groei stimulatie getest door middel van [³H]thymidine incorporatie. De relatieve specifieke activiteit werd verkregen als het quotient van de concentratie gemodificeerd IL-3 die leidde tot een 50 % van de maximale respons en de 50 % maximale respons concentratie van de IL-3 standaard. De activiteit van de standaard op dag 6 bedroeg 1.0 miljoen units/mg eiwit (n = 10; sigma_(n-1) = 0.2 miljoen) en voor dag
- 30 10 bedroeg hij 0.2 miljoen units/mg eiwit. (n=10; sigma_(n-1) = 0.07 miljoen).

Resultaten:

- Met betrekking tot de precieze karakterisatie van de reactiemengsels met betrekking tot het gemiddelde aantal gemodificeerde groepen, de specificiteit en de plaatsen van de
- 35 modificaties op het molecuul wordt verwezen naar de verderop beschreven methoden. De activiteits testen zijn gedaan als hiervoor beschreven.

De gemiddeldes en uitersten van minimaal 3 waarnemingen van de gemodificeerde interleukines zijn gebruikt in vergelijking tot het ongemodificeerde hIL-3 (Tabel 1). Uit tabel 1 volgt dat modificatie bij pH 5 met Azijnzuur anhydride op dag 6 een significante verhoging geeft in de thymidine incorporatie t.o.v. ongemodificeerd IL-3.

- 5 Bovendien blijkt dat modificatie bij pH 5 - 6 met Succinic anhydride op dag 6 en dag 10 een significante verhoging geeft in de thymidine incorporatie t.o.v. ongemodificeerd IL-3.

Tabel 1: Relatieve biologische activiteiten van gemodificeerd Interleukin-3

Modificatie:	Relatieve specifieke activiteiten:	
	6 dagen-culture	10 dagen- culture
Interleukin-3 (standaard)	1.0	0.23
<u>Chemische modificaties</u>		
Acetic anhydride	pH=5.0	1.5(1.4-2.1)
	pH=6.0	1.4(0.83-1.5)
	pH=6.5	0.9(0.77-0.95)
	pH=7.0	0.5(0.43-0.61)
Succinic anhydride	pH=5.0	0.2(0.17-0.30)
	pH=6.0	0.6(0.61-0.65)
	pH=6.5	1.7(1.6-2.0)
	pH=7.0	1.6(1.2-2.5)
	pH=5.0	1.3(1.3-1.4)
	pH=6.0	1.4(1.2-1.8)
	pH=6.5	0.4(0.39-0.48)
	pH=7.0	0.3(0.22-0.35)

35 Voorbeeld 2:

Een methode tot graduele chemische modificatie van biologisch actieve peptiden of eiwitten ter verkrijging van een peptide of eiwit met een tegengestelde werking .

Materialen en methoden:

- 40 Ureum, EDTA, MES, NaOH en Histidine hydrochloride, waren van Sigma. Het Na-Iodo-acetaat was van Fluka. MES/NaOH is gebruikt voor modificatie bij pH 6.0. Tien maal geconcentreerde stockoplossingen werden gemaakt en direct gesteriliseerd door middel van een 0.22 micron filter. Het reactie mengsel bevatte 50 mM buffer 2 mg/ml

humaan Interleukine-3(hIL-3) . Er was 5.5 M ureum en 50 mM EDTA nodig om voldoende modificatie te verkrijgen.

1. Zwaardere modificatie van hIL-3:

- 5 Het Joodacetaat werd toegevoegd in een concentratie 3, 10 en 30 mM. Modificatie van 2 mg/ml humaan Interleukine-3(hIL-3) werd gedurende 24, 48 en 72 uur bij 37 °C gedaan en vervolgens werd het op natieve gel gezet. Bij 2 dagen en 30 mM Joodacetaat was er geen uitgangsmateriaal meer zichtbaar (dus minder dan 5 %). Omdat hier minimale resterende gewone biologische activiteit te verwachten was zonder ernstige
10 blijvende denaturatie van het eiwit, is met dit monster verder gegaan. Met SDS-electroforese werd vastgesteld dat het hIL-3 niet afgebroken was na de modificatie. Bij de controle werd IL-3 als boven behandeld, behalve dat er geen Joodacetaat werd toegevoegd aan de reactie-oplossing.

15 *2. Partiële modificatie van hIL-3:*

- Ter optimalisering van de remmende capaciteit van het gemodificeerde hIL-3, werd er ook partiële modificatie toegepast. Modificatie van 1 mg/ml IL-3 werd gedurende 18 uur bij 37 °C gedaan met Joodacetaat in een concentratie 10, 30 en 100 mM. Na natieve electrophorese en coomassie kleuring was er bij 100 mM Joodacetaat maximale
20 modificatie van het hIL-3, zonder dat er vervaging van de banden op de gel optrad. Er was nog een zeer geringe hoeveelheid (c.a. 5 %) uitgangsmateriaal over.

3. Activiteits- en remmings-testen

- De activiteits testen zijn gedaan als beschreven in voorbeeld 1. Groei respons curves
25 ($n \geq 2$) voor zowel de controle als het gealkyleerde IL-3 zijn gemaakt door tien voudige seriële verdunning van 1000 tot 1 ng/ml. Remmende activiteit van het gealkyleerde IL-3 werd getest door dezelfde titratie van controle-IL-3 maar nu in aanwezigheid van 3 ng/ml gealkyleerd IL-3.

- Ter bepaling van een maximaal haalbare remmende capaciteit werd partiëel gealkyleerd
30 IL-3 getitreerd in seriële zeven voudige verdunningen en in aanwezigheid van 3 ng/ml natief IL-3. De titratie-range was van 15000 ng/ml tot 0.1 ng/ml en er werden maar 4 $\cdot 10^3$ MO-7 cellen/ml gebruikt om cel sterfte door uitputting van het medium uit te sluiten.

35

Resultaten:

Uit figuur 1 blijkt dat het gemodificeerde IL-3 in staat is het controle hIL-3 met een factor 10-100 te remmen. Bovendien blijkt het gemodificeerde IL-3 in een concentratie van 3 ng/ml de gewone IL-3 bij een concentratie van 30-100 ng/ml nog voor 80 to 90 % te remmen. Het gemodificeerde IL-3 heeft dus niet alleen een remmende werking, maar

ook een verhoogde receptor binding t. o.v. controle IL-3. Dit laatste blijkt ook uit figuur 2; de titratie van partiëel gemodificeerd IL-3. Er vind hier zelfs bij een hoeveelheid van 3ng/ml natief IL-3 een remming van bijna 50 % plaats met een concentratie van 0.1 ng/ml van partiëel gealkyleerd IL-3. Dit impliceert een c.a. 30 keer betere receptor binding.

Voorbeeld 3:

Karakterisatie en localisatie van modificaties in een peptide of eiwit met behulp van protease behandeling en massaspectrometrie.

De karakterisatie beperkt zich hier tot reactie-specificiteit. Dit is gedaan door de combinatie van de resultaten van natieve elektroforese en electrospray massa spectrometrie. Doordat iedere acylering van een groep een toename geeft van de negatieve lading van het molecuul, wordt deze zichtbaar als mobiliteitstoename van het molecuul in de natieve gel na coomassie kleuring. Op deze manier kan het aantal gemodificeerde residuen op ladingsbasis gevonden worden. Met electrospray massa spectrometrie(ESMS) kan vaak ook voldoende nauwkeurigheid worden bereikt om het gemiddeld aantal modificaties via massa gerelateerde veranderingen te bepalen. Als nu blijkt dat beide bepalingen het zelfde gemiddelde aantal modificaties oplevert, dan geeft ieder modificatie van een groep ook een ladingsverandering en is de reactie dus specifiek voor amine residuen.

De lokalisatie van de modificaties kan daarna bepaald worden door specifieke protease behandelingen en laser desorptie massaspectrometrie (LDMS) dat een meer eenvoudige interpretatie van digesten toelaat dan ESMS. De nauwkeurigheid van de gebruikte LDMS bleek tot 0.1 - 0.2 % terug te brengen. Daar de aminozuurvolgorde van het hIL-3 bekend is, gaf dit ons de mogelijkheid om op eenvoudige, milde en gevoelige wijze de met specifieke proteases gegenereerde peptiden te identificeren. Endo Glu C geeft juist een onbelemmerde knip bij Asp en Glu residuen, terwijl Endo Lys C niet meer op de Lys-residuen kan knippen na acylering. Doordat bij de LDMS het signaal bij de molecuul massa's van de digesten voldoende aanwezig was, bleek het mogelijk alle modificaties te lokaliseren.

Materiaal en methoden:

Bepaling van reactiespecificiteit

Voor de werkwijze van native electroforese, zie de publicatie: Native Electrophoresis to monitor chemical modification reactions of hIL-3¹³. Bij de electrospray massa spectrometrie (ESMS) werden de IL-3 monsters uitverdund tot een eiwitconcentratie van 0.1 mg/ml in 50% V/V methanol in water met 1 % azijnzuur. Daarna werd gemeten op een TSQ- 700 triple quadrupole massa spectrometer, uitgerust met een electrospray interface.

10 Endoprotease behandeling.

Ter localisatie van de gemodificeerde residuen werd het gemodificeerde materiaal tegen de gewenste buffer gedialyseerd en geknipt met de endoproteasen Endo Glu-C of Endo Lys-C. Er werd geknipt volgens de specificaties van de fabrikant (Boehringer Mannheim, Duitsland), waarbij overnacht werd geknipt bij 37 °C, 2mg/ml hIL3 en een eiwit/protease verhouding van 30.

Laser Desorptie Massaspectrometrie(LDMS):

Voorbehandeling:

Oplossingen van 10 g/l 2,5 dihydroxybenzoic acid (DHB, $M_r = 154.12$) werden voor ieder experiment vers gemaakt in Mili-Q water. Zowel de eventueel gemodificeerde IL-3 oplossingen, als de digesten werden verdund tot 0.1 mg/ml. Van deze verdunde oplossingen werd 0.5 µl gemengd met 0.5 µl DHB-oplossing op de target. Vervolgens werd aan de lucht gedroogd bij kamertemperatuur in een zachte luchtstroom.

Massa spectrometrie:

25 Matrix Assisted Laser Desorptiemassa spectrometrie is gedaan op een Finnegan MAT Vision 2000 laser desorptie massa spectrometer, voorzien van een 'pulsed nitrogen laser (337 nm, pulsewidth 3 ns). Het monster werd bestraald tot juist boven de drempel tot het verkrijgen van ionen (10^6 - 10^7 W/cm²). Het acceleratie voltage was 6.5 kV. De ionen werden naversneld tot de conversie-dynode op - 10 kV voor de electronen-versterken. De standaard nauwkeurigheid is ongeveer 0.05%, maar door de experimentele condities kan deze afnemen tot 0.1-0.2 %.

Resultaten:

35 De reactie specificiteit werd bevestigd doordat de resultaten van de ESMS voldoende resolutie gaven om zelfs een volledige scheiding te krijgen van de shift van de pieken alsgevolg van de verschillende modificaties bij succinic anhydride (zie figuur 3). Bij

Acetic anhydride was er geen volledige scheiding van de massa's van verschillende aantallen modificaties. Hierbij is het gemiddelde van alle verschillende massa's bepaald. Het is gebleken dat de gemiddelde aantallen, bepaald met massa-spectrometrie, en met natieve electroforese gelijk waren. Daarom waren de modificaties specifiek voor amine residuen.

Doordat bij de LDMS het signaal ondanks hogere molecuul massa voldoende aanwezig was bleek het ook mogelijk alle modificaties te localiseren. Er zijn twee voorbeelden gegeven, een voor alleen Endo-Lys-C en een voor de combinatie van Endo Glu-C en Endo Lys C.

1- *Localisatie van de modificatie met Succinic anhydride (pH 5.0) met behulp van Endo Lys-C behandeling en LDMS.*

Bij de pH 5.0-Succinic anhydride modificatie die met Endo Lys-C geknipt werd (Figuur 4) verschoof de piek van 1085 d naar 1185 d, tevens verschoof de piek van 1108 d ($1085 + 23$ van een Na^+) naar 1208 d. Deze verschuiving heeft precies de massa van een Succinyl groep (100 d). De 1085 d piek kan op basis van de aminozuur volgorde en de protease specificiteit alleen maar worden terug gebracht tot $\text{Ala}^1 - \text{Lys}^{10}$. Aangezien modificatie van Lys^{10} tot gevolg zou hebben dat er geen knip meer zou plaats vinden op die plek, zou er helemaal geen $\text{Ala}^1 - \text{Lys}^{10}$ fragment meer zijn en dus ook geen piek bij 1185 d. Daarom is het gemodificeerde amine residu het amino-uiteinde Ala^1 .

2- *Detectie van modificatie van Lys^{28} met Acetic anhydride door middel van Endo Glu-C behandeling met LDMS en Endo Lys-C behandeling met LDMS.*

Bij de pH 7.0-Acetic anhydride modificatie die met Endo Glu-C geknipt werd, schoof de piek van 1598 d naar 1640 d (figuur 5). Deze verschuiving had precies de massa van 1 Acetyl groep. Ook nu kon op basis van de aminozuurvolgorde dit stuk herleid worden tot $\text{I}^{23} - \text{D}^{36}$. Aangezien alleen Lys^{28} zich daar bevindt, leidt dit tot de slotconclusie dat Lys^{28} gemodificeerd is. Dit werd bevestigd bij de Endo Lys-C knip waar een fragment van 5815 d ontstond. Dit fragment is alleen verklaarbaar als Lys^{28} het gemodificeerde residu is, zodat er niet meer na Lys^{28} geknipt kon worden.

De andere modificaties zijn op analoge wijze geanalyseerd en het bleek dat alle modificaties gevonden konden worden. Dit resulteerde in Tabel 2 waarbij ook bleek dat bij de beide modificaties de aangrijp-punten op het eiwit hetzelfde zijn, alleen bij de Acetic anhydride modificatie is vanaf pH 5 meer gemodificeerd t.o.v. Succinic anhydride en bij pH 7.0 was ook Lys^{10} gedeeltelijk gemodificeerd i.t.t. bij Succinic anhydride.

Tabel 2 :Localisatie van modificaties op humaan Interleukine-3

5	10	Percentage gemodificeerde groepen voor:			
		Gemodificeerd bij :	Acetic anhydride	Succinic anhydride	
		pH			
		5.0	ala ¹ : >90 %	ala ¹ : >90%	
15		6.0	ala ¹ : >90 % lys 28 : ±45 % lys 66 : ±20 % lys 100: ±40 % lys 116: ±40 %	ala ¹ : >90% lys 28 : ±45 % lys 66 : ±20 % lys 100: ±25 % lys 116: ±40 %	
20		6.5	ala ¹ : >90 % lys 28 : ±70 % lys 66 : ±50 % lys 100: ±65 % lys 116: ±80 %	ala ¹ : >90% lys 28 : ±55 % lys 66 : ±40 % lys 100: ±50 % lys 116: ±90 %	
25		7.0	ala ¹ : >90 % lys 10 : ±20 % lys 28 : ±55 % lys 66 : ±35 % lys 100: ±65 % lys 116: ±40 %	ala ¹ : >90% lys 28 : ±70 % lys 66 : ±40 % lys 100: ±70 % lys 116: ±90 %	
30					
35					

Tabel 2 laat ook zien dat Lys¹¹⁶ bij pH 7 op zijn minst gedeeltelijk beschermd is. Daar bij die pH een fosfaatbuffer gebruikt is, zou het kunnen dat een fosfaatgroep op die plaats bindt en daarmee de Lys¹¹⁶ afschermt voor modificatie.

Om deze hypothese te testen is het hIL-3 gemodificeerd bij 50 mM buffer, gevormd door een mengsel van MES en fosfaat. Er is gemodificeerd met 1, 2 en 3 mM Acetic anhydride en bij pH 6.8 waar beide buffers nog goed bufferen. In aanwezigheid van 10 of meer mM fosfaat was er bescherming van Lys¹¹⁶. Bij lager of gelijk aan 1 mM fosfaat was deze bescherming afwezig. Aangezien 10 mM fosfaat de fysiologische concentratie is, volgt

uit deze waarneming dat zelfs biologisch significante fosfaatbinding met de onderhavige lokalisatiemethode kan worden waargenomen en gelokaliseerd. Derhalve is het zeer wel denkbaar om een antagonist, dan wel celgroei remmer te maken door deze fosfaatbinding te verstoren. Ook dit wordt dus geacht onder de uitvinding te vallen. Verder kan nog opgemerkt worden dat de residuen Lys²⁸ en Lys⁶⁶ ook een zeer geringe bescherming door de fosfaat kregen. Dit suggereert een nabijheid in de 3D-structuur. Er wordt op deze manier dus zelfs structuurinformatie opgedaan.

Tenslotte valt nog op te merken dat de graduele chemische modificatie met minimale reactie gedaan kon worden, waarbij een specificiteit bereikt werd tot niet alleen enkele types residuen, maar ook tot alleen het amine residu en zelfs tot maar 1 amine residu op het hele molecuul namelijk Ala¹. Derhalve is deze specificiteit ook in de conclusies opgenomen.

15 Voorbeeld 5:

Kwantitatieve Structuur-Functie Relatie (KSFR) onderzoek met behulp van graduele chemische modificatie, protease behandeling en Laser Desorptie Massa Spectrometrie.

KSFR-strategie

20 Dit voorbeeld is gedemonstreerd met lysine modificaties op humaan Interleukine-3. De strategie is opgebouwd uit 5 stappen waarvan de eerste stap een graduele chemische modificatie van het eiwit betreft. Hoewel de micro-omgeving van de verschillende residuen in de 3-D structuur niet bekend is, kunnen alleen al op grond van de aminozuurvolgorde verschillen worden verwacht. Meer verschillen zijn te verwachten door de interacties als gevolg van de 3-D structuur. Wij hebben hierbij acylerings-reacties op hIL-3 onderzocht. Deze reacties vinden alleen plaats op ongeladen Lys-residuen, hetgeen de mogelijkheid verschaft om gradueel te modificeren door de pH van de modificatie reactie geleidelijk te verhogen.

De tweede stap is het volgen van de modificatiereactie. Om een voldoende aantal mogelijkheden na te gaan ter bepaling van de meest gunstige omstandigheden is een makkelijke milde en gevoelige methode nodig. Dit is gedaan met native electroforese.

30 De derde stap is de bevestiging van de algemene structurele integriteit. Circulair Dichroïsme Spectroscopie kan daarvoor gebruikt worden. Hoewel kleine verschillen met deze spectroscopie niet gevonden worden, zijn grote structurele veranderingen (denaturatie) zeer goed waarneembaar.

De vierde stap vormt de karakterisatie en localisatie van de gemodificeerde residuen, hiervoor zijn ESMS, natieve elektroforese en digestie met specifieke proteases en LDMS gebruikt. De reactie specificiteit is bepaald door een combinatie van natieve elektroforese en ESMS. Voor de localisatie zijn endoproteasen en LDMS gebruikt. De methode is beschreven in voorbeeld 3.

De vijfde en laatste stap is het testen van de biologische activiteit van de verschillende gemodificeerde vormen van het eiwit. Na deze activiteitsbepaling kan de echte betrokkenheid van de betreffende gelocaliseerde residuen in de biologische activiteit worden afgeleid.

Chemische modificatie, structuur bevestiging en volgen van de reactie:

Chemische modificatie van het hIL-3 en de monitoring met natieve elektroforese is gedaan zoals eerder in dit patent beschreven is. In dit voorbeeld is het IL-3 gemodificeerd met Acetic anhydride en met Succinic anhydride. Met behulp van Circulair dichroïsme werd gevonden dat met de Succinic anhydride modificatie boven pH 7 een algemene structuurverandering (denaturatie) plaats vond. Daarom zijn alleen de modificaties beneden of gelijk aan pH 7 nader bekeken.

Karakterisatie en localisatie van modificaties in een peptide of eiwit met behulp van protease behandeling en massaspectrometrie

Zie hiervoor voorbeeld 3.

Activiteitstesten van de verschillende gemodificeerde vormen van het eiwit en localisatie van biologisch belangrijke residuen.

De activiteitstesten zijn uitgevoerd zoals beschreven in voorbeeld 1, waarin ook de resultaten staan. De combinatie van deze resultaten en de resultaten van de localisatie van gemodificeerde residuen (voorbeeld 3 en Tabel 2), leidt tot uitspraken over de betrokkenheid van de verschillende residuen. Hierbij is de overgang van ongemodificeerd naar pH 5.0 gemodificeerd materiaal van belang (activiteits-stijging van groter dan een factor 2) en de verschillen tussen pH 6.0 en pH 6.5 (activiteits-daling van circa een factor 2) en tussen pH 6.5 en 7.0 (activiteits-stijging: factor 2).

Daar bij de Succinic anhydride modificatie bij pH 5.0 de activiteits-stijging gepaard gaat met de modificatie van 1 groep, namelijk de Amino-terminus (Ala¹), valt te concluderen dat deze groep een beperkende ofwel regulerende werking vertoont ofwel de groep is van belang voor stabiliteit van het IL-3. De activiteitstoename is ook gevonden bij structuur-

functieonderzoek met deletiemutanten 2, 6, maar was toen niet herleid tot het eerste residu alleen.

Bij de verschillen tussen pH 6.0 en pH 6.5 is het probleem meer gecompliceerd: Voor acetic anhydride ging de met een factor 2-4 dalende activiteit gaat gepaard met een
5 modificatie van Lys²⁸ van 45 % naar respectievelijk 70 % van de groepen, van Lys⁶⁶ van 20 % van de groepen naar \pm 50 % van de groepen en van Lys¹⁰⁰ van 40 % naar 65 % van de groepen. Tenslotte vond een modificatie plaats van 40 % naar 80 % van Lys¹¹⁶. Dit geeft een verandering van ongemodificeerd materiaal van 60 % resterend naar 20 % resterend, een factor 3 verschil. Daar deze modificatie toename overeenkomt met de
10 activiteits afname is Lys¹¹⁶, kan de activiteits afname verklaard worden door modificatie van Lys¹¹⁶. Dit wordt verder bevestigd door de factor 3 verminderde modificatie van Lys¹¹⁶ bij pH 7. Deze veermindering van modificatie ging gepaard met een activiteitsstijging met een factor 2-3. Daarom valt te concluderen dat Lys¹¹⁶ van belang is voor biologische activiteit.

15 Dit beeld werd ook gevonden door de modificatie met succinic anhydride. Daarbij was echter geen activiteits verhoging van het bij pH7 gemodificeerde materiaal te vinden t.o.v. het bij pH 6.5gemodificeerde materiaal. Er was echter evenmin een afname in modificatie van Lys¹¹⁶.

Er is gebleken dat de residuen Lys¹¹⁶ en de aminoterminus van belang zijn voor de
20 activiteit, waarbij de aminoterminus een remmende (regulerende) of destabiliserende invloed lijkt te hebben en Lys¹¹⁶ van belang is voor de activiteit. Bovendien wordt Lys¹¹⁶ beschermd door fosfaat, hetgeen een fosfaatbinding door dat residu suggereert. Hieruit volgt dat fosfaatbinding van belang kan zijn voor de werking van het Interleukine-3. Als dit proces van belang is voor Interleukine-3 dan kan dit dus ook van
25 belang zijn bij andere peptiden en eiwitten.

Kort samengevat kunnen met deze methode biologisch belangrijke residuen gevonden worden, en bovendien is met de fosfaatbinding van hIL-3 ook een mogelijk belangrijk fysiologisch proces gevonden en gelokaliseerd. Derhalve omvat de uitvinding ook het
30 modificeren van een peptide of eiwit ter introductie van een verbeterde of nieuwe, bij voorkeur antagonistische activiteit door middel van het veranderen van fosfaat binding van het signaal peptide of eiwit. .

Conclusies:

- 1- Een methode ter lokalisering van chemisch gemodificeerde aminozuren met behulp van een specifieke protease behandeling, bij voorkeur een endoprotease behandeling, en
5 massa spectrometrie, bij voorkeur laser desorptie massaspectrometrie; deze methoden worden bij voorkeur voorafgegaan door natieve elektroforese en electrospray massa spectrometrie ter bepaling van reactie-specificiteit.
- 2- Een methode ter lokalisering van bij biologische activiteit betrokken aminozuren
10 van een peptide of eiwit, door middel van chemische modificatie, bij voorkeur op graduele wijze, in combinatie met activiteitstesten en lokalisatie van de gemodificeerde residuen, als omschreven in voorgaande conclusie.
- 3- Een methode tot chemische modificatie van humaan Interleukine-3 met als doel de
15 aanbrenging van bij voorkeur een of meer van de volgende eigenschappen: verhoogde biologische activiteit, verhoogde stabiliteit, verlaagde antigeniciteit, verkregen antagonistische activiteit of celremmende werking.
- 4- Een methode als in conclusie 3 met als kenmerk dat de modificatie graduele
20 modificatie betreft, bij voorkeur met variatie van een of meer van de volgende omstandigheden: pH, tijd, reagens- of substraat concentraties.
- 5- Een methode als conclusie 4 met als kenmerk dat de modificatie uitgevoerd wordt onder een pH die gradueel gevarieerd wordt tussen 5.0 en 7.0, bij voorkeur in stappen van
25 0.5 pH eenheden.
- 6- Een methode als conclusie 4 met als kenmerk dat de modificatie uitgevoerd wordt onder een reagens concentratie die gradueel gevarieerd wordt tussen 3 en 100 mM, bij voorkeur in stappen van een factor 3.3.
30
- 7- Een methode als een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat de modificatie uitgevoerd wordt onder reactie omstandigheden waarbij de te modificeren residuen voor modificatie bereikbaarheid worden gemaakt door voldoende reversibel
35 M, en bij voorkeur voldoende chelerend agens, bij voorkeur EDTA, bij voorkeur in een

concentratie van circa 50 mM, bij voorkeur om beschermende ionen, bij voorkeur Zn-ionen te verwijderen.

- 5 8- Een methode tot modificatie van signaal-peptiden of eiwitten met als kenmerk dat de modificatie doelbewust gericht is op een of meer direct of indirect bij katalytische activiteit betrokken aminozuren, bij voorkeur Histidine residuen. De katalytische activiteit heeft als kenmerk dat hij op zijn minst gedeeltelijk afkomstig is van het signaal peptide of eiwit. De modificatie is bij voorkeur chemisch en bij voorkeur gradueel chemisch en bij voorkeur als omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies.
- 10 9- Een methode als methode 8 met als doel de aanbrenging van een antagonistische en/of celremmende werking.
- 15 10- Een methode tot modificatie van peptiden of eiwitten met als doel de aanbrenging van een antagonistische en/of celremmende werking door de fosfaatbinding van het signaal peptide of eiwit te verstoren. De modificatie is bij voorkeur chemisch en bij voorkeur gradueel chemisch en bij voorkeur als omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies.
- 20 11- Een methode tot modificatie van peptiden of eiwitten met als doel de aanbrenging van een antagonistische en/of celremmende werking door de fosfatase activiteit van het peptide of eiwit te verstoren. De modificatie is bij voorkeur chemisch en bij voorkeur gradueel chemisch en bij voorkeur als omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies.
- 25 12- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies 3 en verder, waarbij de modificatie is uitgevoerd, dan wel geoptimaliseerd is m.b.v. de methoden, omschreven in conclusies 1 en 2.
- 30 13- Humaan interleukine-3 met een verbeterde werking doordat het chemisch en bij voorkeur gradueel chemisch gemodificeerd is en bij voorkeur geacyleerd en bij voorkeur met azijnzuur anhydride of succinic anhydride.
- 35 14- Chemisch gemodificeerd humaan interleukine-3 dat bij voorkeur gradueel chemisch gemodificeerd is en bij voorkeur gealkyleerd en bij voorkeur met een halo acetaat, bij voorkeur jood azijnzuur.

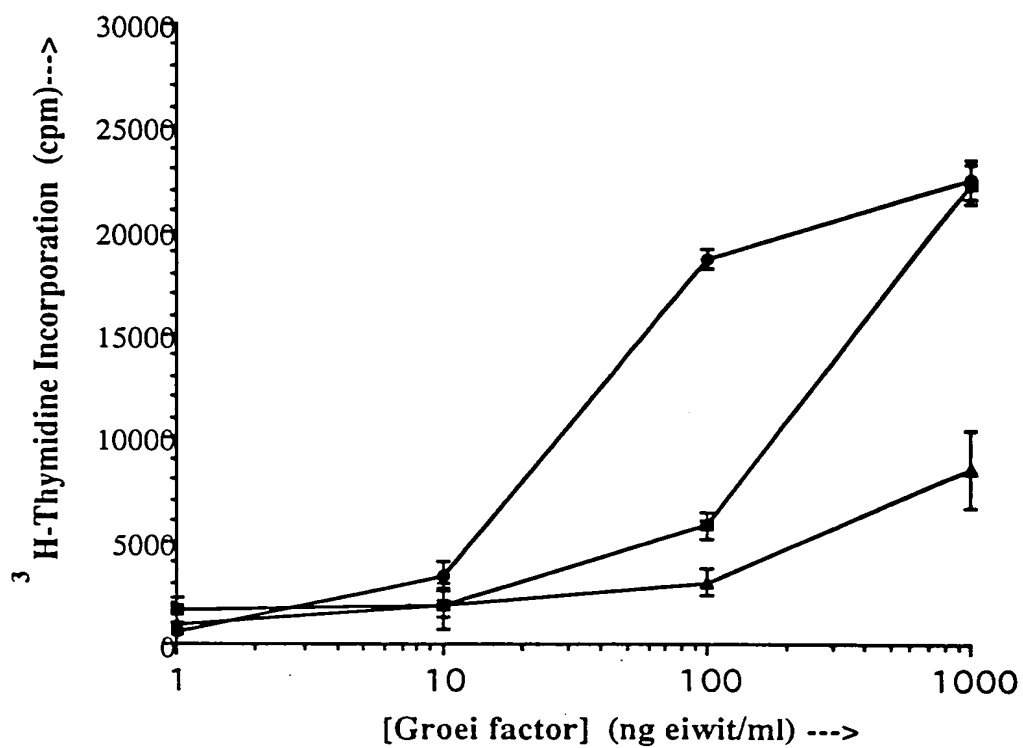
- 15- Gemodificeerd humaan Interleukine 3, bij voorkeur gemodificeerd volgens een of meer van de voorafgaande methoden met als kenmerk dat modificatie plaats vond ter plekke van alleen een of meer van de volgende residuen : Ala¹, His²⁶, Lys²⁸, Lys⁶⁶, His⁹⁵, His⁹⁸, Lys¹⁰⁰ of Lys¹¹⁶.
- 16- Een methode van selectieve modificatie van bepaalde aminozuren op een peptide of eiwit waarbij gebruik gemaakt wordt van graduele modificatie en reversibele reagentia als in een of meer van de voorgaande methoden.
- 17- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat niet wordt uitgegaan van humaan Interleukine 3 maar van een of meer van de volgende, bij voorkeur humane, eiwitten of peptiden: andere Interleukinen, heamapoietische groeifactoren, peptidehormonen of eiwithormonen, signaalpeptiden of signaaleiwitten, biologisch actieve eiwitten of peptiden.
- 18- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat de antigeniciteit verlaagd wordt door afscherming van de mogelijke interacties van antigene respons opwekkende aminozuren in het peptide of eiwit .
- 19- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat de stabiliteit verhoogd wordt als gevolg van afscherming van mogelijke interacties van aminozuren die een aangrijpingspunt zijn voor proteasen.
- 20- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat de klaringstijd uit het lichaam verlengd wordt alsgevolg van afscherming van mogelijke interacties van aminozuren die een aangrijpingspunt zijn voor oxiderende enzymen of natuurlijk voorkomende oxiderende agentia.
- 21- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat de receptor binding van het eiwit of peptide wordt versterkt doordat aminozuren die deze receptorbinding negatief beïnvloeden worden afgeschermd.
- 22- Een methode als in een of meer van de voorgaande conclusies met als kenmerk dat de receptor binding van het eiwit of peptide wordt versterkt doordat een nieuwe chemische interactie in het peptide of eiwit wordt ingebouwd.

- 23- Een methode als in conclusie 22 met als kenmerk dat een lading op het molecuul wordt aangebracht, bij voorkeur een negatieve lading.
- 5 24- Ieder preparaat dat een gemodificeerd peptide of eiwit bevat, (zowel in de vorm van een mengsel, als in de vorm van een verbinding,) dat gemaakt is met gebruik van een of meer van de methoden zoals beschreven in een of meer van de voorgaande conclusies.
- 10 25- Het gebruik van ieder preparaat zoals omschreven in een of meer van de voorgaande conclusies.

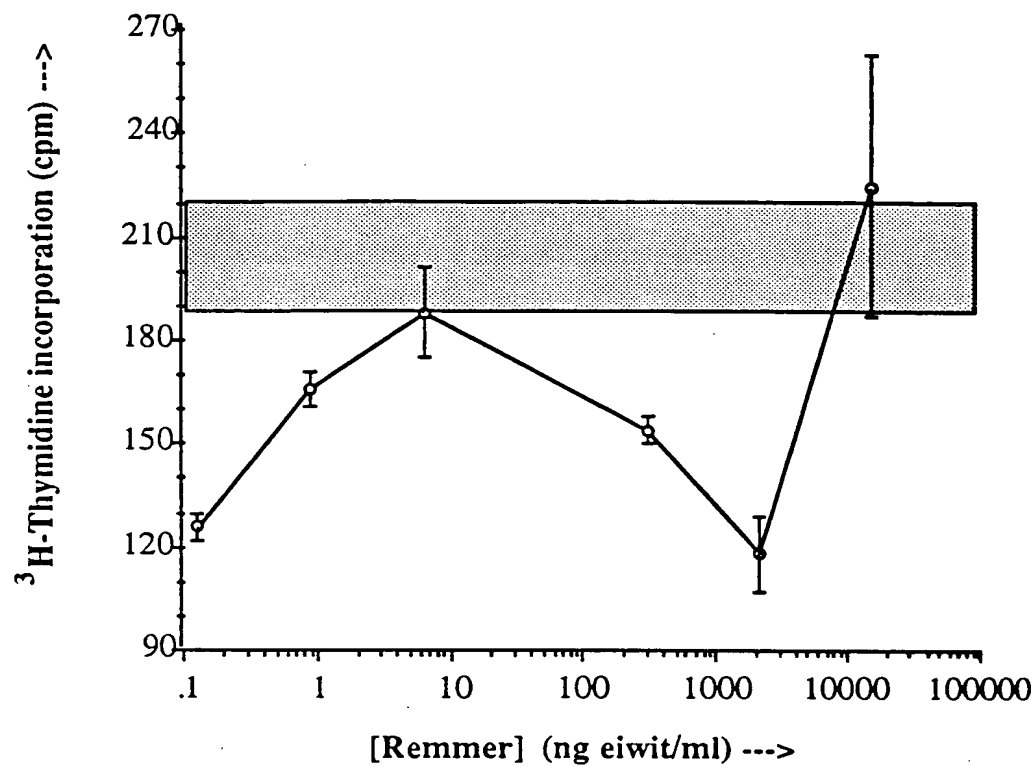
Literatuur:

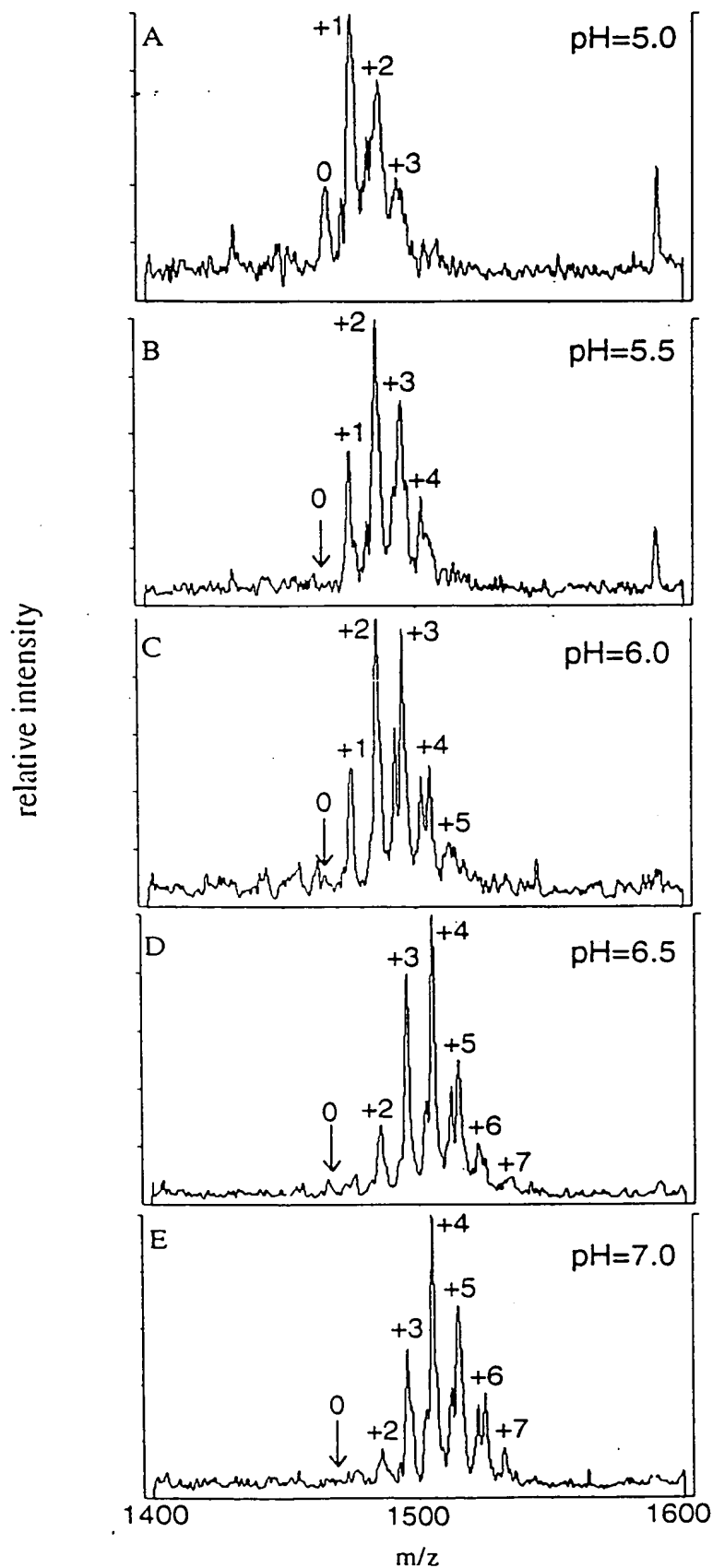
1. Dorssers, L.C., *et al. Gene* **55**, 115-124 (1987).
- 5 2. Dorssers, L.C., *et al. J Biol Chem* **266**, 21310-21317 (1991).
3. Kaushansky, K., *et al. J Clin Invest* **90**, 1879-88 (1992).
4. Lokker, N.A., *et al. J Immunol* **146**, 893-8 (1991).
5. Lokker, N.A., Zenke, G., Strittmatter, U., Fagg, B. & Movva, N.R. *Embo J* **10**, 2125-31 (1991).
- 10 6. Lopez, A.F., *et al. Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 11842-6 (1992).
7. Okada, S., *et al. Endocrinology* **130**, 2284-90 (1992).
8. Conti, P., *et al. Scand J Immunol* **36**, 27-33 (1992).
9. Okigaki, M., Komada, M., Uehara, Y., Miyazawa, K. & Kitamura, N. *Biochemistry* **31**, 9555-61 (1992).
- 15 10. Aversa, G., *et al. J Exp Med* **178**, 2213-8 (1993).
11. Fuh, G., *et al. Science* **256**, 1677-80 (1992).
12. Smit, V., van Veelen, P.A., Tjaden, U.R., van, d.G.J. & Haaijman, J.J. *Biochem Biophys Res Commun* **187**, 859-66 (1992).
13. Smit, V. *Electrophoresis* **15**, 251-4 (1993).

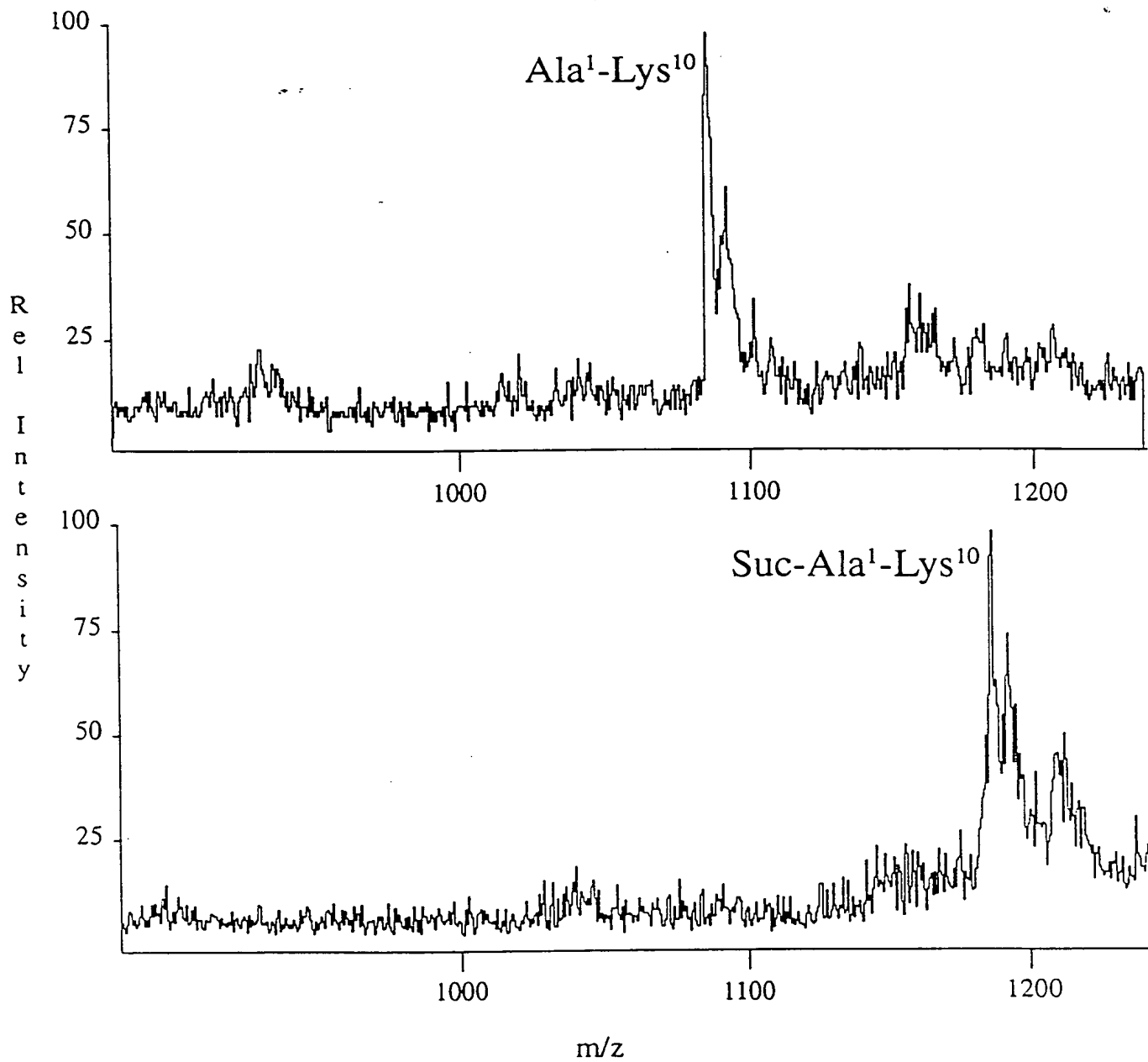
Figuur 1

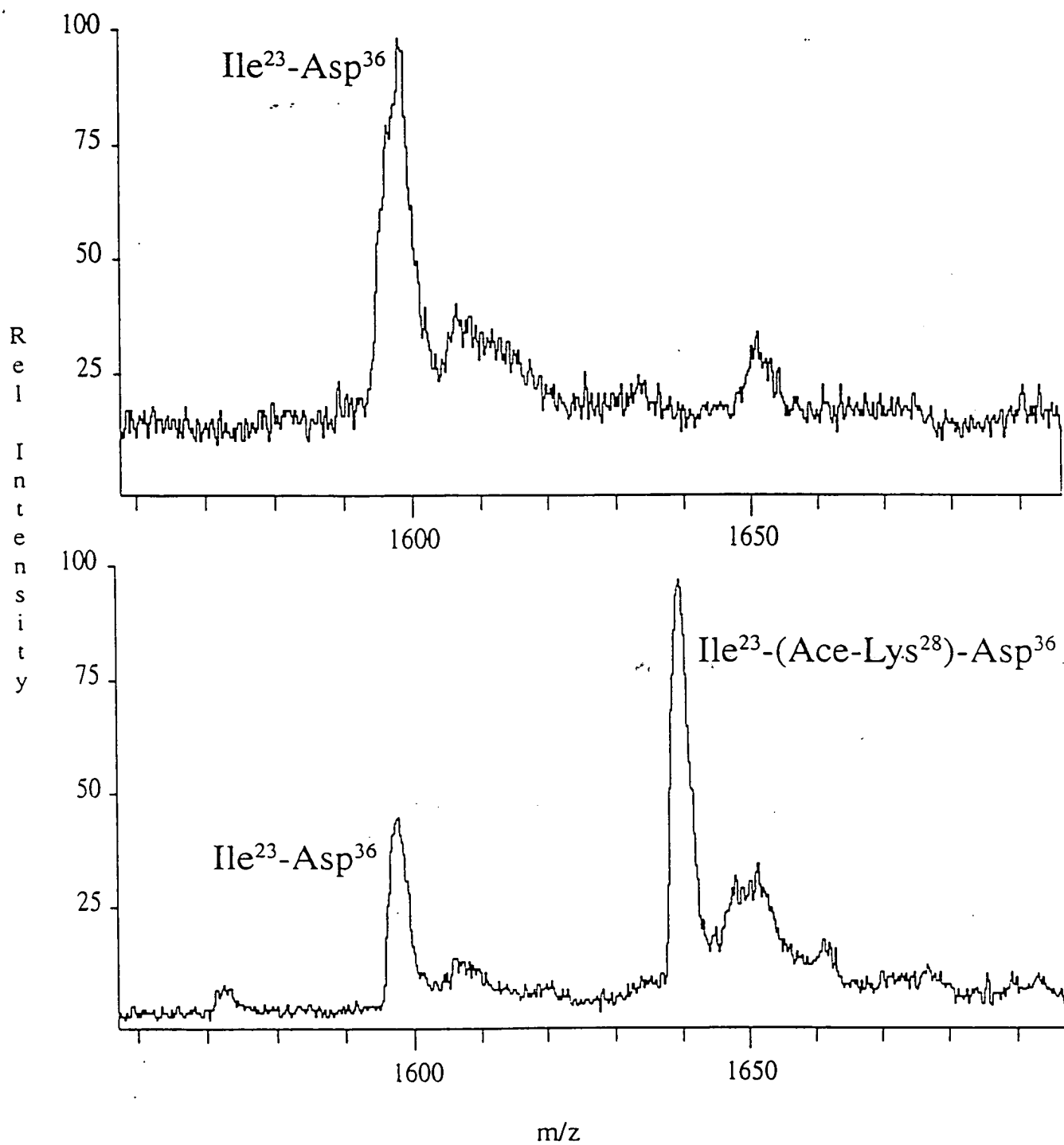


Figuur 2









THIS PAGE BLANK (USPTO)